

A. M. Jousseaux¹ · B. Kirchhof¹ · C. Gottstein²

¹ Abteilung für Netzhaut- und Glaskörperchirurgie und Zentrum für Molekulare Medizin, Universität zu Köln

² Labor für Tumorthherapie, Innere Medizin I, Universität zu Köln

Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese

Möglichkeiten antiangiogener Therapie

Zusammenfassung

Mechanismen der Angiogenese und Vaskulogenese involvieren komplexe Interaktionen zwischen Endothelzellen, periendothelialen Zellen, der extrazellulären Matrix und Bestandteilen des Blutes. Wir kennen die „Vokabeln“ und versuchen die Regeln zu verstehen, denen Gefäßaussprossung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen folgt. Angiogenese und Vaskulogenese sind in der Augenheilkunde therapeutisch nutzbar, aber auch außerhalb der Augenheilkunde, wie z. B. im Rahmen der Arteriosklerose, des Tumorwachstums, der myokardialen Ischämie und der Wundheilung.

Schlüsselwörter

Vaskulogenese · Angiogenese · Wachstumsfaktoren · Endothelzellen · Perizyten · Endotheliale Vorläuferzellen

Vaskulogenese (Tabelle 1) bezeichnet die Entstehung von Blutgefäßen in der frühen Embryogenese aus Endothelzellvorläufern und „Angioblasten“. Durch die Arbeiten von Jeff Isner, Boston, und Shahin Rafii, New York, ist bekannt, dass dieser Prozess auch im Erwachsenenalter auftritt. Hierbei spielen endotheliale Stammzellen eine Rolle [2, 3, 22, 29].

Angiogenese (s. Tabelle 1) im klassischen Sinne beschreibt die Aussprossung von Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen. In beiden Fällen differenzieren sich Zellen des umgebenden Mesenchyms entweder zu Perizyten (Kapillaren) oder zu glatten Muskelzellen (größere Gefäße). Die Betrachtung lediglich der Endothelzellen vermag Gefäßwachstum nicht hinreichend zu erklären. Die Kenntnis der molekularen Regelungsmechanismen im Zusammenspiel von Endothelzellen, periendothelialen Zellen, Matrixmolekülen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren eröffnet neue Therapieansätze für Erkrankungen, die mit einer gestörten Gefäßbildung einhergehen.

Vaskulogenese

Bereits um 1900 wurde gezeigt, dass isolierte Zellen von Embryonen ein Blutgefäßnetzwerk bilden konnten. Die Zelle, aus der sich alle Endothelzellen rekrui-

tierten, wurde Angioblast genannt. Hämangioblast war die Bezeichnung für einen gemeinsamen Vorläufer von Endothelzellen und Zellen der hämatopoetischen Reihe. Erst 100 Jahre später konnte das Vorhandensein von Hämangioblasten experimentell bestätigt werden [15]. Die Differenzierung der pluripotenten Vorläuferzellen in Hämangioblasten wird zumindest teilweise durch Wachstumsfaktoren wie bFGF induziert. Die ersten Marker, die von Endothelzellen sowie auch von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert werden, sind CD31, CD34 und der Tyrosine-Kinase-Rezeptor Typ 2 von VEGF (VEGF-R2 oder KDR/Flk-1) [47]. Das zunächst entstehende primitive Netzwerk differenziert sich durch Verstärkung bestimmter Gefäße und Rückbildung anderer Gefäße („branching and pruning“) dann in ein reifes Gefäßsystem [40].

Ursprünglich nahm man an, dass Vaskulogenese nur im embryonalen Zustand stattfindet und von mesodermalen Vorläuferzellen abhängig ist. Diese

© Springer-Verlag 2003

Gefördert durch DFG Jo 324/6-1, DFG Jo 324/4-1, DFG SFB502-T6, Köln Fortune, ZMMKT V76.

PD Dr. Antonia M. Jousseaux
Abteilung für Netzhaut- und Glaskörperchirurgie, Zentrum für Augenheilkunde, Universität zu Köln,
Joseph-Stelzmann-Straße 9, 50931 Köln
E-Mail: JousseauxA@aol.com

Ein Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen findet sich am Ende des Textes.

Molecular mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis. What regulates vascular growth?

Abstract

The basic mechanisms governing how endothelial cells, periendothelial cells, matrix molecules and blood constituents interact with each other are discussed. The many insights gained from this basic knowledge are being extended to further understand physiological and pathological features of vascular sprouting and maintenance. Understanding these basic principles that drive angiogenesis and vasculogenesis will lead to a more specific therapy of many disorders in ophthalmology and other fields, such as arteriosclerosis, tumor growth, myocardial ischemia and tissue repair.

Keywords

Vasculogenesis · Angiogenesis · Growth factors · Endothelial cells · Pericytes · Endothelial progenitor cells

Tabelle 1
Definitionen

Angiogenese	Aussprossen von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen
Vaskulogenese	Entstehung von Blutgefäßen aus mesodermalen Vorläuferzellen wie Angioblasten und Hämangioblasten
VEGF (Vascular endothelial growth factor)	Früher VPF („vascular permeability factor“ genannt) – 50.000-mal stärkere Permeabilitätserhöhung als Histamin 32–44kd Protein, das von fast allen Zellen sezerniert werden kann. Durch unterschiedliches Spalten der mRNA entstehen 5 Isoformen VEGF ₁₂₁ , VEGF ₁₄₅ und VEGF ₁₆₅ werden sezerniert VEGF ₁₈₉ und VEGF ₂₀₆ sind zellständig Rezeptoren: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR, Flk-1) und VEGFR-3

Vorstellung kann heute nicht mehr aufrechterhalten werden. Am Beispiel der Tumorangiogenese lässt sich zeigen, dass das Wachstum von Gefäßen häufig eine Kombination aus Angiogenese und Vaskulogenese ist, bei der zirkulierende Endothelzellvorläufer zum Wachstum der Endothelzellmasse beitragen (Abb. 1). Die postnatale Angioblastendifferenzierung scheint durch VEGF, VEGFR-2 und bFGF gefördert zu werden, während VEGFR-1 (Flt-1) die Differenzierung hemmt [20]. Genetisch veränderte Mäuse, die eine der löslichen Isoformen von VEGF nicht produzieren können, haben dennoch solche endotheliale Vorläuferzellen. Dagegen besitzen Tiere ohne VEGF-R2 solche Zellen nicht. Dies lässt zusätzliche Mechanismen vermuten, die mit einer VEGF-R2-Bindung einhergehen.

Angiogenese

Angiogenese vollzieht sich schrittweise. Anfangs erweitern sich bereits vorhandene Gefäße und werden vermehrt durchlässig. Proteasen aus dem umgebenden Gewebe verdauen Teile des Stromas sowie der Basalmembran. Das ermöglicht es den aktivierten und proliferierenden Endothelzellen, zu wandern (Migration) und schließlich Lumen auszubilden (Abb. 2). Die Endothelzellen dieser aussprossenden neuen Gefäße und mit ihnen die sie umgebenden periendothelialen Zellen und die umgebende Matrix differenzieren dann weiter

unter dem Einfluss der lokalen Umgebung (s. Abb. 2). Die einzelnen Schritte sind im Folgenden genauer beschrieben:

Dilatation existierender Gefäße, Anstieg der Permeabilität und Abbau der extrazellulären Matrix

Vasodilatation eröffnet die Angiogenese und erfolgt hauptsächlich als Antwort auf NO (Stickoxid). NO kann VEGF hochregulieren [25], das seinerseits die Gefäßpermeabilität steigert (VEGF=VPE, „vascular permeability factor“), und zwar durch Reorganisation von Adhäsionsmolekülen wie PECAM-1 oder VE-Cadherin.

Angiopoietin-1 (Ang-1), ein Ligand des Endothelzellrezeptors Tie-2, ist ein natürlich vorkommender Antipermeabilitätsfaktor [44]. Ein anderes Mitglied der Angiopoietinfamilie – Angiopoietin-2 (Ang-2), ein Inhibitor der Tie-2-Signaltransduktion und natürlicher Antagonist von Ang-1 – verstärkt das Aussprossen von Endothelzellen [29]. Ang-2 trägt dazu bei, glatte Muskelzellen von Endothelzellen abzulösen und die extrazelluläre Matrix aufzulösen. Dadurch wird die Migration von Endothelzellen angeregt. Ang-2 konnte in Speichergranula von Endothelzellen nachgewiesen werden und kann auf Stimulation innerhalb von 30 Minuten ausgeschüttet werden.

Die Auflösung der extrazellulären Matrix erfordert Proteinase, die nicht nur den „Platz“ für die proliferierenden Endothelzellen schaffen, sondern auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren

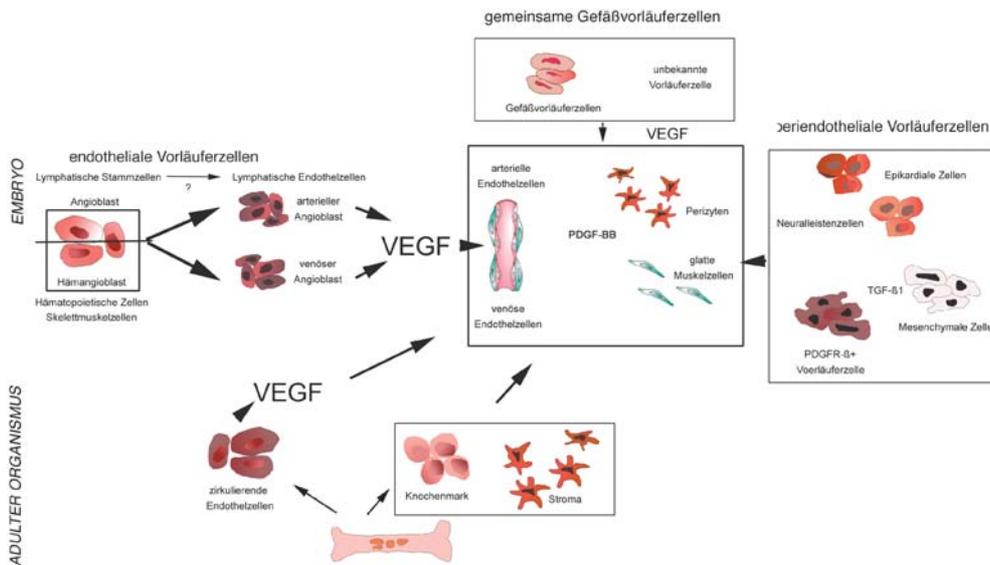


Abb. 1 ◀ **Herkunft von Gefäßzellen im adulten und embryonalen Organismus**

wie VEGF, bFGF, und IGF-1 ermöglichen [6, 32]. Derzeit sind über 20 Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bekannt, die Einfluss auf die Angiogenese und Zellproliferation haben. Natürliche Antagonisten der Matrixmetalloproteinasen sind die gewebsständigen Inhibitoren (TIMPs) [10]. Durch Freisetzung von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 und gleichzeitig durch Hemmung von TIMP-2 kann Ang-1 auch ein Aussprossen von Endothelzellen initiieren [24].

Endothellzellproliferation und Migration

Wenn die physikalischen Barrieren durch die Auflösung der extrazellulären Matrix aufgelöst werden, können sich die Endothelzellen aus dem Verband lösen. Es setzt eine komplexe Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren (VEGF, FGFs, HGF u. a.), Differenzierungsfaktoren (z. B. den Angiopoetinen) und den zugehörigen Rezeptoren ein.

Am besten untersucht sind die Auswirkungen von VEGF und bFGF, jedoch könnte auch anderen Wachstumsfaktoren, von denen weniger bekannt ist, eine wichtigere Rolle zukommen, als bisher angenommen.

Verschiedene Stoffwechselwege können ein und denselben Angiogeneschritt mehrfach stimulieren. Ang-1 bewirkt über den Rezeptor Tie-2 ein Aussprossen von Endothelzellen [42]. Ang-2 kann in der Kombination mit VEGF ebenfalls das Aussprossen von Endothelzellen induzieren, führt aber in Abwesenheit von VEGF zu einer Gefäßregression.

PDGF wirkt angiogen auf aussprossende Endothelzellen und rekrutiert Perizyten um wachsende Gefäßsprosse [28]. eNOS (endotheliale Stickstoffoxidsynthase) hat ebenfalls angiogene Eigenschaften und wird durch VEGF aktiviert. Verschiedene Mitglieder der TGF- β -Familie wie Activin A und TNF-alpha stimulieren oder inhibieren das Wachstum von Endothelzellen in verschiedenen Modellen. Auch einige Chemokine, unter anderem MCP-1, induzieren Endothelzellwachstum. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die derzeit diskutierten Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren.

Endothelzellen organisieren sich und formieren Stränge, die ein Lumen bilden

Endothelzellen, die in die Matrix einwachsen, bilden solide Stränge, die nachfolgend ein Lumen bilden. Dies wird durch eine Interkalation und eine Verdünnung der Endothelzellen erreicht, zusammen mit einer Fusion mit existierenden Gefäßen, um letztlich ein längeres Gefäß zu bilden. Die Sonder-

form des intussuszeptiven Wachstums wird separat diskutiert.

Der Durchmesser des Gefäßlumens ist durch eine Reihe von Faktoren reguliert. VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ und ihre Rezeptoren beispielsweise vergrößern das Gefäßlumen, wohingegen VEGF₁₈₉ den Gefäßdurchmesser verringert. Ang-1 vergrößert in Kombination mit VEGF ebenfalls den Gefäßdurchmesser. Darüber hinaus sind verschiedene Integrine (alpha5 β 1 und alpha ν 3 β 3) involviert, deren Funktion über RGD-Peptide unterbunden werden kann, was bereits verschiedentlich therapeutisch genutzt wurde [5]. Thrombospondin-1 (TSP-1) kann als endogener Inhibitor der Lumenbildung angesehen werden.

Intussuszeptives Gefäßwachstum

Das intussuszeptive Gefäßwachstum beschreibt die Bildung eines Gefäßnetzwerks aus einem mit Endothelzellen ausgekleideten Gefäß durch Spaltung eines Gefäßes oder Einsetzen von Gewebssprossen. Dieses Gefäßwachs-

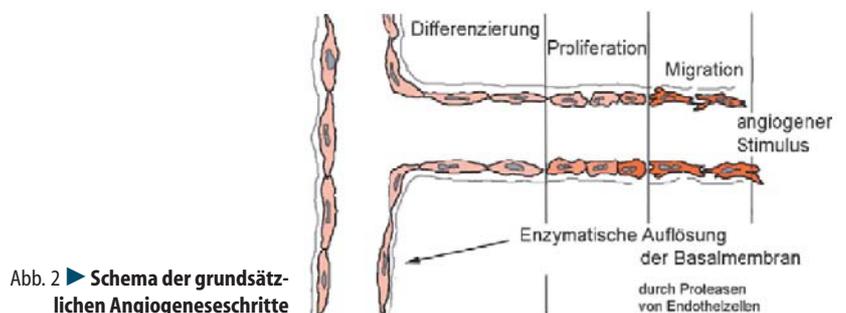


Abb. 2 ▶ **Schema der grundsätzlichen Angiogeneseschritte**

Tabelle 2

Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren. (Nach [16])**Angiogeneseaktivatoren**

VEGF, VEGF-C und Homologa	Stimuliert Angiogenese und Permeabilität VEGF-C stimuliert Lymphangiogenese
VEGF Rezeptoren (VEGFR)	VEGFR-2: Rezeptor für angiogene Signaltransduktion VEGFR-3: Rezeptor für lymphangiogene Signaltransduktion Neuropilin-1 (NP-1): bindet spezifisch VEGF 165, Korezeptor von VEGFR-2
Angiopoietin-1- (Ang-1-) und Tie-2-Rezeptor	Ang-1: stabilisiert Gefäße durch Förderung der Perizytenendothelinteraktion, verhindert die Gefäßpermeabilität Ang-2: destabilisiert die Gefäße vor dem Aussprossen
PDGF-BB und Rezeptoren	Rekrutierung von Gefäßmantelzellen (periendothelialen Zellen)
TGF- β 1, Endoglin, TGF- β -Rezeptoren	Stabilisierung von Gefäßen durch Stimulation einer extrazellulären Matrixproduktion
FGF, HGF, MCP-1	Stimulieren Angiogenese (FGF, HGF) und Arteriogenese (FGF, MCP-1)
Integrine α v β 3, α v β 5, α 5 β 1	Rezeptoren für Matrixmoleküle und -proteinasen (MMP-2)
VE-cadherin, PECAM (CD31)	Endotheliale Junction-Moleküle, essenziell für Endothelzellüberleben Antikörper blockieren das Tumorüberleben
Ephrine	Regulieren die arterielle/venöse Spezifität
Plasminogenaktivatoren, Matrixmetalloproteinasen	Proteinasen sind verantwortlich für die zelluläre Migration und die Rekonstitution der Matrix Freisetzung von bFGF und VEGF aus der Matrix Aktivierung von TGF β 1; Erzeugung von Angiostatin
Plasminogenaktivator-Inhibitor-1	Stabilisiert entstandene Gefäße durch Unterdrückung des Matrixabbaus
Nitric Oxide Synthase (NOS) Cyclooxygenase-2 (COX-2)	NO und Prostaglandine stimulieren Angiogenese und Vasodilatation
Andere Aktivatoren	AC133: bei der Angioblastendifferenzierung beteiligt Inhibitors of differentiation (Id1/Id3): Unterdrückung bestimmter Transkriptionsschritte
Angiogeneseinhibitoren	
VEGFR-1, löslich VEGFR-1 und Neuropilin-1	Bindet bioaktives VEGF, VEGF-B, und VEGF 165 [NP-1 (Neuropilin-1)]
Angiopoietin-2	Antagonist von Angiopoietin-1 Induziert eine Regression von Gefäßen in Abwesenheit eines angiogenen Signals
Thrombospondin-1 (TSP-1), Thrombospondin-2	Extrazelluläres Matrixprotein; Typ 1 inhibiert Endothelzellmigration, -wachstum, -adhäsion, -überleben; TSP-2 inhibiert ebenfalls die Angiogenese
Meth-1, Meth-2	Inhibitoren, die Metalloproteinase-, Thrombospondin- und Disintegrin-Domänen enthalten
Angiostatin und verwandte Plasminogen Kringles	Proteolytische Fragmente von Plasminogen, die Endothelzellüberleben und -migration verhindern
Endostatin	Fragment des Typ-XVIII-Kollagens, inhibiert Endothelzellüberleben und -migration
Vasostatin, Calreticulin	Calreticulin und das N-terminale Fragment (Vasostatin) inhibieren Endothelzellwachstum
Plättchen-Faktor-4	Heparin bindendens CXC-Chemokin inhibiert die Bindung von VEGF und bFGF
Tissue Inhibitors of MMP (TIMPs), MMP-inhibitors, PEX	Unterdrückung der pathologischen Angiogenese PEX: proteolytisches Fragment von MMP2, das die Bindung von MMP2 an Integrin α 5 β 3 verhindert
Interferon (IFN) α , β , γ IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Zytokine und Chemokine, die eine Endothelzellmigration verhindern; IFN führt zu einer Herunterregulation von bFGF
Prothrombin kringle-2, anti-thrombin III fragment	Fragmente homöostatischer Faktoren, die Endothelzellwachstum unterdrücken
Andere Inhibitoren	16 kDa-prolactin: inhibiert bFGF/VEGF

tum resultiert in einem komplexen Gefäßnetzwerk und entsteht über einen nicht sprossenden also im eigentlichen Sinne nicht angiogenen Mechanismus [4]. Gerade in jüngster Zeit wurde dieser Form des Gefäßwachstums wieder mehr Bedeutung für die Ausbildung von Tumorgefäßen [36, 37], aber auch im Hinblick auf die Bildung retinaler Gefäße, beigemessen. Derzeit wird angenommen, dass das Tie-2-Angiopoietin-System für intussuszeptives Gefäßwachstum mit verantwortlich ist. Die molekularen und morphologischen Grundlagen müssen noch genauer untersucht werden.

Langzeitüberleben von Gefäßendothelzellen

Sobald ein neues Gefäßsystem etabliert ist, werden die Endothelzellen gegenüber exogenen Faktoren resistent. In diesem Zustand können sie eine Überlebensdauer von mehreren Jahren haben. Verkürzung der Lebensdauer der Endothelzellen bewirkt eine Gefäßregression, die im adulten Organismus beispielsweise in der Retina oder im Ovar bekannt ist.

Apoptose, d. h. ein programmierter Zelltod, kann bei Endothelzellen durch eine Reihe von Faktoren induziert werden [27]. Eine pathologisch erhöhte Apoptose von Endothelzellen und die daraus folgende Gefäßleckage kann bei der diabetischen Retinopathie beobachtet werden. Die Inhibition der Apoptose reduziert im experimentellen Modell die diabetische Gefäßleckage ([23], s. auch Zusammenfassung diabetische Retinopathie).

VEGF scheint als Überlebensfaktor zu wirken. Hierbei ist VEGF von der Interaktion mit VEGFR-2, PI-3-Kinase und VE-Cadherin abhängig. Fehlt die zytosolische Domäne von VE-Cadherin, kommt es zur Apoptose von Endothelzellen durch die Verhinderung der VEGF-vermittelten Signaltransduktion über Akt-Kinase [11, 12]. Andere Faktoren, die für ein Überleben von Endothelzellen verantwortlich sind, sind wiederum die Angiopoietine über ihren Rezeptor Tie-2. Im Gegensatz zu seinem Gegenspieler Ang-2 hat Ang-1 eine Überlebensfunktion, die zumindest teilweise über antiapoptotische Gene wie Survivin vermittelt wird [35]. Daneben sind verschiedene Moleküle, die den Zell-

zyklus und die Apoptose regulieren wie p53, p21, p16 sowie Bax und p42/44 MAPKinase involviert.

Die Gefäßintegrität hängt in verschiedenen Gefäßbetten auch von hämodynamischen Scherkräften ab, über die nicht nur die metabolischen Erfordernisse für das Zielgewebe bereitgestellt werden, sondern auch der Endothelzellturnover reguliert wird [17, 34].

Das Gefäßendothel differenziert entsprechend den lokalen Anforderungen

Das Gefäßendothelium muss unterschiedlichen lokalen physiologischen Anforderungen genügen. Beispielsweise benötigt die Blut-Hirn-Schranke oder auch die Blut-Retina-Schranke verschiedene Strukturen, die die Gefäße quasi abdichten. Diese sog. Tight-junctions werden aus Membran- und zytosolischen Proteinen gebildet, die zur Gruppe der Cadherine, Occludine, Claudine und anderen gehören. In anderen Gefäßgebieten ist das Endothel hingegen fenestriert und besitzt keine Tight-junctions. Insgesamt sind die Faktoren, die die Ausprägung dieser unterschiedlichen Endothel Eigenschaften regulieren, noch weitgehend unbekannt.

Ausbildung und Reorganisation komplexer Gefäßnetzwerke

Wenn ein Gefäß auf einen angiogenen Stimulus hin wächst, kann es sich durch Intussuszeption (s. oben) spalten. Das Einwachsen von periendothelialen Zellen und die nachfolgende Stabilisation der Gefäßabschnitte führen dann zu einer Neuorganisation des Gefäßnetzes. VEGF fördert neben dem Aussprossen („sprouting“) von Gefäßen auch ihre Teilung („splitting“). Hierzu scheint insbesondere die VEGF₁₆₅-Isoform wichtig zu sein. Ihr Fehlen bewirkt eine reduzierte Verästelung von Gefäßen [12]. Angiopoietin-1 verhindert ebenfalls die Verzweigung von Gefäßen.

Die Induktion von Gefäßverzweigungen scheint auch von lokalen Gegebenheiten abhängig zu sein. Zwei Beispiele hierfür sind Renin, das in Gefäßen der Niere für die Verzweigung verantwortlich ist, sowie aFGF, das in myokardialen Gefäßen eine Rolle spielt [13].

Was unterscheidet Venen von Arterien?

Die Voraussetzungen zur Differenzierung in Arteriolen, Venolen und Kapillaren sind noch nicht hinreichend verstanden. Arterien wie Venen entstehen gleichermaßen aus Angioblasten. Die Signaltransduktion scheint vorwiegend über Notch reguliert zu werden [26]. Die große Familie der Ephrine spielt aber offenbar ebenfalls eine Rolle. Ephrine sind Liganden für ihre korrespondierenden Ephrin-Rezeptoren (Eph). Ephrin A1 und sein Rezeptor EphA2 sind angiogen, die Ephrine B1 und B2 induzieren ein Aussprossen von Gefäßen. Ephrin B2 scheint ausschließlich auf Arterien vorzukommen, während sein Rezeptor (EphB4) nur auf Venen gefunden wird [21, 31]. Wird das Ephrin-B2-Gen bei Mäusen ausgeschaltet, so resultiert zwar eine normale Vaskulogenese, jedoch eine defiziente Angiogenese, bei der sich nur lange schmale Schläuche, jedoch keine Arterien und Venen differenzieren [46].

Funktion der periendothelialen Zellen und der umgebenden Matrix

Periendotheliale Zellen wirken stabilisierend durch Verhinderung der endothelialen Proliferation und Migration. Ohne die periendothelialen Zellen, bestehen Gefäße nur in Anwesenheit eines angiogenen Stimulus fort [7]. Periendothelzellen sind darüber hinaus metabolisch aktiv und exprimieren Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Peptide. Glatte Muskelzellen können sowohl aus Endothelzellen wie aus mesenchymalen Zellen, aber auch aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder aus Makrophagen hergeleitet werden, ihr genauer Ursprung ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (s. Abb. 2). Kürzlich wurden Vorläuferzellen identifiziert, die sich nach Exposition mit VEGF zu Endothelzellen differenzieren, nach Exposition mit PDGF-BB aber zu glatten Muskelzellen entwickeln [48].

Periendotheliale Zellen lassen sich durch mehrere Faktoren rekrutieren (Abb. 3). PDGF-BB wirkt als Chemotaxin für Perizyten [28]. Ang-1 und Tie-2 festigen die Interaktion zwischen periendothelialen Zellen und Endothelzellen (s. Abb. 3). Die TGF- β -Familie (TGF- β 1, TGF- β -Rezeptor-2, Endoglin und

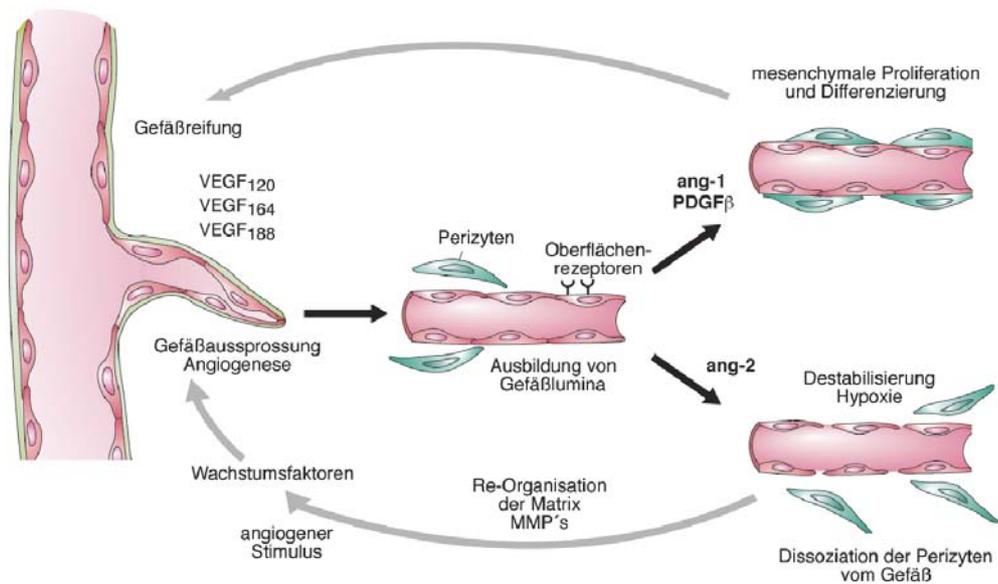


Abb. 3 ◀ Gefäßstabilisierung und Umbau im erwachsenen Organismus

Smad5) fördert die Differenzierung glatter Muskelzellen. Tissue factor (TF) rekrutiert Perizyten wahrscheinlich über Aktivierung der Gerinnungskaskade und Thrombinbildung.

Die extrazelluläre Matrix bildet nicht nur die solide Grundstruktur, durch die die Endothelzellen wandern können, sondern steuert auch verschiedene Wachstumsfaktoren bei. Beispielsweise ist das Integrin $\alpha v \beta 3$, das die Bindung an Kollagen vermittelt, essenziell für das Überleben und die Ausreifung von Blutgefäßen während der Angiogenese. Anderen Matrixkomponenten wie Laminin, Vitronectin, Osteopontin, Fibrin und Thrombospondin werden ähnliche Eigenschaften zugeschrieben.

Die Sauerstoffsättigung reguliert das Gefäßwachstum

Bekanntlich reguliert Hypoxie die RNA-Expression des Wachstumsfaktors VEGF. Das gilt ebenso für weitere Genprodukte, die an der Regulation der Angiogenese beteiligt sind: VEGFR-1, VEGFR-2, Neuropilin-1, Neuropilin-2, Ang-2, NOS, TGF- β 1, PDGF-BB und IL-8 [41]. Ein Transkriptionskomplex, gebildet aus hypoxieinduzierten Faktoren (HIF), kann verschiedene Angiogenesegene aktivieren. Bei Normoxie wird HIF-1 α schnell über VHL, ein Genprodukt, das für die Von-Hippel-Lindau-Angiomatose verantwortlich ist, degradiert [30]. Bei der diabetischen Retinopathie aktiviert HIF-1 α die VEGF-Expression [38].

Die Regulation angiogener Faktoren erfolgt über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege. Der PI-3-Kinase/Akt-Komplex stabilisiert HIF-1 α . MAP-Kinase aktiviert Erk-1/2 und darüber hinaus weitere Faktoren, die eine erhöhte Transkription des VEGF-Genes bewirken.

Pathologische Angiogenese

Pathologische Angiogenese zeichnet sich durch eine quantitativ fehlgesteuerte Gefäßbildung (verstärkte oder verringerte Angiogenese) sowie durch funktionell inadäquate Gefäße aus. Dabei liegt ein Ungleichgewicht von stimulatorischen und inhibitorischen Faktoren zugrunde. Beispiele für pathologische Angiogenese sind die diabetische Retinopathie, die Tumorneoangiogenese sowie die verstärkte Angiogenese im Rahmen der rheumatoiden Arthritis. Bei manchen Erkrankungen wie der Arteriosklerose wäre eine Erhöhung der reaktiv einsetzenden Angiogenese wünschenswert. Bei anderen Erkrankungen wie beim Diabetes ist das Krankheitsbild, abhängig vom Umfeld, gekennzeichnet durch einen Untergang von Gefäßen mit Ischämien oder Proliferationen. So ist bei der proliferativen diabetischen Retinopathie (Abb. 4b) eine Hemmung der Neoangiogenese wünschenswert, während bei der diabetesassoziierten koronaren Herzkrankung eine Neoangiogenese gerade therapeutisch wünschenswert wäre.

Bei der Tumorangiogenese entstehen wirre, nicht ausreichend ausgereifte Gefäßnetzwerke, die in einer heterogenen Durchblutung des Tumorgewebes resultieren (s. Abb. 4a). Während an manchen Stellen durch die erhöhte Permeabilität Blutbestandteile vermehrt austreten, findet sich an anderen Stellen gar kein oder sogar ein retrograder Blutfluss. Dies erschwert eine effiziente Applikation von antineoplastischen Medikamenten.

Beim uvealen Melanom des Auges wurde zuerst die mit „vascular mimicry“ bezeichnete besondere Morphologie mancher Tumorgefäße beschrieben. Es handelt sich dabei um blutdurchflossene Kanäle, in denen keine Endothelzellauskleidung nachgewiesen werden konnte. Zunächst heftig umstritten, wurde das Vorhandensein solcher Kanäle mehr und mehr akzeptiert, wobei sich später auch der Begriff der „Mosaikgefäße“ durchsetzte (Gefäße, deren Auskleidung teilweise aus Endothelzellen und teilweise aus Tumorzellen besteht) [14, 19].

Die pathologische Angiogenese ist grundsätzlich durch ähnliche molekulare Mechanismen gesteuert, wie die oben beschriebene physiologische Angiogenese. Von großer Wichtigkeit sind die Charakteristika des umliegenden Gewebes und die Ursache der pathologischen Vaskularisation (z. B. Entzündungen der Hornhaut, Hypoxie bei der Retinopathia praematurorum).

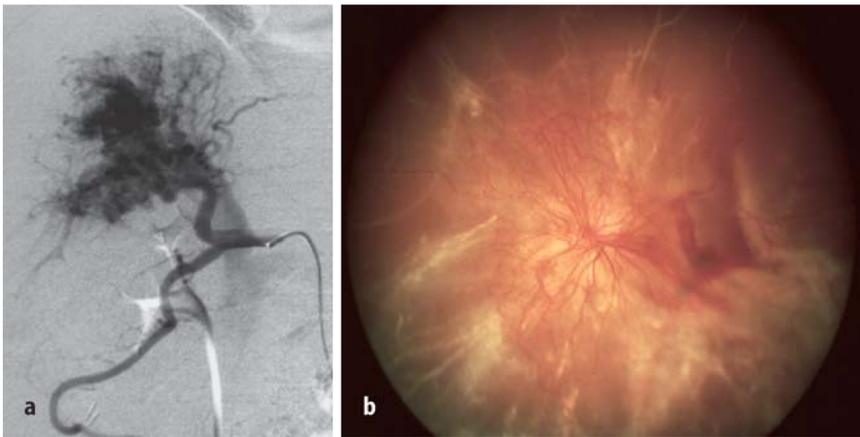


Abb. 4 ▲ **Pathologisches Gefäßwachstum im Tumor (a) und in der Retina (b).**
(Fotonachweis Abb. 4a: Prof. Dr. Krug/Dr. Zähringer, Institut für Radiologie der Universität zu Köln)

Therapeutische Ansatzpunkte

Vor Beginn einer Behandlung muss festgelegt werden, welche Gefäße inhibiert werden sollen und wie notwendige Versorgungsgefäße geschützt werden können. Bei chorioidalen Neovaskularisationen oder der diabetischen Makulopathie wäre es vielleicht ausreichend, lediglich gezielt die Leckage zu hemmen und eine Regression physiologischer Gefäße nicht zu riskieren. Auch bei der Therapie maligner Tumoren muss ausgeschlossen werden, dass normale Gefäße in Mitleidenschaft gezogen werden. Zahlreiche Angiogenesehemmer stehen zur Verfügung (s. Tabelle 2). Von den synthetischen und endogenen Inhibitoren sind Angiostatin und Endostatin in der Tumorforschung recht ausführlich untersucht worden [9, 33]. In der Augenheilkunde ließ sich bislang kein Erfolg versprechender Einsatz dieser Substanzen erkennen [1]. Der Schlüssel zu einem wirksamen Ansatz scheint hier – wie anderswo – in der gezielten Verabreichung der Medikamente zu liegen, die nur auf die Zielzellen wirkt. Bei systemischer Applikation könnten in der Zukunft Bio-konjugate eine Rolle spielen, bei denen durch antikörper- oder ligandenvermittelte Bindung eine Anreicherung im Zielgewebe erzielt werden kann (s. unten). Für lokale Applikationen ist die Galenik von großer Bedeutung. Eine protrahierte Wirkstofffreisetzung wäre oft förderlich, da es sich um chronische Erkrankungen handelt. Erst die geeignete Kombination von Applikationsform und therapeutischem Agens lassen Fort-

schritte in der Therapie vasogen bedingter Erkrankungen erwarten.

Zahlreiche präklinische und klinische Daten liegen für den Einsatz angiogenesebezogener Therapeutika bei malignen Tumoren in der Augenheilkunde nur eine untergeordnete Rolle spielen, lassen sich doch aus diesen Studien Erkenntnisse für den Einsatz bei ophthalmologischen Erkrankungen ziehen. In mehr als 200 klinischen Studien wurden etwa 80 verschiedene Substanzen getestet. Auch wenn eine generelle Aussage aufgrund der Heterogenität der Substanzgruppe schwierig ist, kann man leider feststellen, dass die klinischen Ansprechraten die großen Hoffnungen, die aus den präklinischen Experimenten entstanden waren, bisher nicht erfüllt haben. Insbesondere zeigte sich, dass die Hemmung einzelner Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF, weit weniger effektiv war, als aufgrund der Daten aus den Mausmodellen angenommen. Präparate oder Kombinationsbehandlungen, die mehrere Systeme des gleichen Angiogeneseschritts hemmen, scheinen hingegen Erfolg versprechender zu sein. Zurzeit wird auch nach prädiktiven Parametern gesucht, die eine Auswahl von Patienten, die auf bestimmte Angiogenesehemmer ansprechen, erlaubt.

Neben Angiogeneseinhibitoren werden bei malignen Tumoren vermehrt andere, ebenfalls auf Gefäße gerichtete Substanzen eingesetzt:

1. Antivaskuläre Substanzen, die Tumorgefäße selektiv schädigen wie

- z. B. Combretastatin und ZD6126 [8, 45];
- 2. spezifische vaskuläre Okklusions-induzierende Substanzen, die beispielsweise mittels antikörpervermittelter Targeting bestimmte Gefäße nach systemischer Gabe verschließen können [43].

Die rekombinante Herstellung solcher Moleküle ist bereits möglich [18] und erlaubt ein maßgeschneidertes Design auf molekularer Ebene.

Danksagung Sascha Fauser sei für hilfreiche Diskussionen gedankt.

Abkürzungen (Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Signaltransduktionsmoleküle)

VEGF	Vascular endothelial growth factor
KDR/Flk-1	kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase; VEGF receptor-2
Flt-1	fms-like tyrosine kinase (Flt); VEGF receptor-1
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IGF	Insulin-like growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
HIF	Hypoxia inducible factor
HGF	Hepatocyte growth factor
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
MIP-1	Macrophage inhibitory protein
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31)
VE-cadherin	Vascular endothelial cadherin (tight junction molecule)
PDGF	Platelet derived growth factor
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
IL-8	Interleukin-8

Literatur

- Ambati BK, Joussem AM, Ambati J et al. (2002) Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 120:1063–1068
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221–228
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H et al. (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18:3964–3972
- Augustin HG (2001) Tubes, branches, and pillars. The many ways of forming a new vasculature. *Circ Res* 89:645–647
- Bayless KJ, Salazar R, Davis GE (2000) RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Am J Pathol* 156:1673–1683
- Bergers G, Brekken R, McMahon G et al. (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 10:737–744
- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998) A plasticity window for blood vessel remodeling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125:1591–1598
- Blakey DC, Westwood FR, Walker M et al. (2002) Antitumor activity of the novel vascular targeting agent ZD6126 in a panel of tumor models. *Clin Cancer Res* 8:1974–1983
- Boehm T, Folkman J, Browder T et al. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390:404–407
- Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267–283
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L et al. (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98:147–157
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D et al. (1999) Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF 164 and VEGF 188. *Nat Med* 5:495–502
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389–395
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM et al. (2000) Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14608–14613
- Choi K (1998) Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol* 76:947–956
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49:507–521
- Dimmeler S, Händeler J, Rippmann V et al. (1996) Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399:71–74
- Gottstein C, Wels W, Ober B, Thorpe PE (2001) Generation and characterization of recombinant vascular targeting agents from hybridoma cell lines. *Biotechniques* 30:190–200
- Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AL (2000) Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156:361–381
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng K (1999) Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126:3015–3025
- Helbling PM, Saulnier DM, Brandli AW (2000) The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development* 127:269–278
- Heissig B, Hattori K, Dias S et al. (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109:625–637
- Joussem AM, Poulaki V, Pak J et al. (in press) Diabetic leukocytes mediate vascular endothelial cell apoptosis via Fas – Fas ligand mediated pathway. *FASEB J*
- Kim I, Kim HG, Moon SO et al. (2000) Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 86:952–959
- Kimura H, Weisz A, Kurashima Y et al. (2000) Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide. *Blood* 95:189–197
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR et al. (2000) Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14:1343–1352
- Kockx MM, Knaepen MW (2000) The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol* 190:267–280
- Lindahl P, Bostrom H, Karlsson L et al. (1999) Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and atherogenesis. *Curr Top Pathol* 93:27–33
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF et al. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55–60
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW et al. (1999) The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271–275
- McBride JL, Ruiz JC (1998) Ephrin-A1 is expressed at sites of vascular development in the mouse. *Mech Dev* 77:201–204
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18:1135–1149
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y et al. (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79:315–328
- Pages G, Milanini J, Richard DE et al. (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann N Y Acad Sci* 902:187–200
- Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K et al. (2000) Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* 275:9102–9105
- Patan S, Tando S, Roberge S et al. (2001) Vascular morphogenesis and remodeling in a human tumor xenograft: blood vessel formation and growth after ovariectomy and tumor implantation. *Circ Res* 89:732–739
- Patan S, Munn LL, Tando S et al. (2001) Vascular morphogenesis and remodeling in a model of tissue repair: blood vessel formation and growth after ovariectomy and tumor implantation. *Circ Res* 89:723–731
- Poulaki V, Qin W, Joussem AM et al. (2002) Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor 1-alpha and VEGF. *J Clin Invest* 109:805–815
- Rafii S, Shapiro F, Rimarchin J et al. (1994) Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* 84:10–19
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671–674
- Semenza GL (2000) HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dec* 14:1983–1991
- Suri C, Jones PF, Patan S et al. (1996) Requisite role of angiopoietin-1 a ligand for the TIE-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87:1171–1180
- Thorpe PE, Ran S (2000) Tumor infarction by targeting tissue factor to tumor vasculature. *Cancer J* 3[Suppl 6]:S237–244
- Thurston G, Rudge JS, Ioffe E et al. (2000) Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Medicine* 6:460–463
- Tozer GM, Kanthou C, Parkins CS, Hill SA (2002) The biology of the combretastatins as tumour vascular targeting agents. *Int J Exp Pathol* 83:21–38
- Wang, HU, Chen ZF, Anderson DJ (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93:741–753
- Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA et al. (1993) flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118:489–498
- Yamashita J, Itoh H, Harishima M et al. (2000) Flk-1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92–96